

Krista Forsström

Veden raudan määrittäminen spektrofotometrisellä menetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Insinööri
Bio- ja elintarviketekniikka
Insinöörityö
27.4.2011

Tekijä(t) Otsikko	Krista Forsström Veden raudan määrittäminen spektrofotometrisellä menetelmällä
Sivumäärä Aika	26 sivua + 3 liitettä 27.04.2011
Tutkinto	Insinööri
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaaja(t)	Yliopettaja Jukka Toivonen Kemisti Marit Björkstrand
<p>Insinööriyössä oli tavoitteena validoida standardin SFS 3028 mukainen spektrofotometrisen menetelmä veden raudan määrittämiseen laboratoriossa käytössä olleen Hach-Langen testin tilalle tai sen rinnalle. Hach-Langen kyvettitestin nykyinen määrittämiss raja oli 50 µg/l ja uudelle menetelmälle oli tavoitteena määrittämiss raja 20 µg/l. SFS 3028 –menetelmä ottaa huomioon orgaaniseen ainekseen sitoutuneen raudan, mitä Hach-Langen menetelmä ei huomioi. Toisaalta Hach-Langen kyvettitesti oli huomattavasti nopeampi analyysimenetelmä kuin SFS 3028.</p> <p>SFS 3028 -menetelmän validoitavia parametrejä olivat menetelmän satunnaisvirhe, toistokyky, määrittämiss raja ja toteamisraja, systemaattinen virhe, herkkyys, mittausalue, lineaarisuus ja epävarmuus sekä menetelmien välisen systemaattisen eron tarkistaminen.</p> <p>Insinööriyön lopputuloksena menetelmän määrittämiss rajaksi tuli 37 µg/l ja toteamisrajaksi 33 µg/l. Menetelmän epävarmuus oli liian korkea näytteillä, joiden pitoisuus oli alle 250 µg/l, ja vaatii lisänäytteiden tekemistä. Epävarmuus oli sallitulla tasolla näytteissä, joissa rautaa oli yli 250 µg/l. Mittausalueeksi todettiin menetelmän lineaarinen alue. Menetelmän toistettavuus oli hyvä.</p>	
Avainsanat	spektrofotometria, rauta, validointi, Hach-Lange

Author(s) Title	Krista Forsström Title of the Thesis
Number of Pages Date	26 pages + 3 appendices 27 April 2011
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Instructor(s)	Jukka Toivonen, Principal Lecturer Marit Björkstrand, Chemist
<p>The purpose of this thesis project was to validate the standard (SFS 3028) spectrophotometric method for determination of iron in the water. The object of this study was to enhance the laboratory's Hach-Langen test with the SFS 3028 method. The Hach-Lange Powder Pillow Test's current limit of quantification was 50 µg/l, and the new method's goal is the limit of 20 µg/l. The SFS 3028 method takes the iron bound to organic matter into account, which is not considered in The Hach-Langen method. Hach-Lange Powder Pillow Test was a much faster analysis method than the SFS 3028.</p> <p>The validation parameters of the SFS 3028 method were random error of method, repeatability, limit of detection, limit of quantification, bias, sensitivity, measuring range, linearity, uncertainty and control of the systematic difference between methods.</p> <p>As a result of the project, the SFS 3028 method's limit of quantification was validated as 37 µg/l and its limit of detection at 33 µg/l. Uncertainty was too high in samples with an iron concentration less than 250 µg/l and will require additional samples to be taken. Uncertainty reached permissive levels in samples with an iron concentration of 250 µg/l and more. The measuring range for the method was same as the linear range. The method had good repeatability.</p>	
Keywords	spectrophotometry, iron, validation, Hach-Lange

Sisällys

1 Johdanto	1
KIRJALLINEN OSA	2
2 Rauta vedessä	2
2.1 Esiintyminen	2
2.2 Talousveden rauta	3
3 Spektrofotometria	4
3.1 Menetelmän periaate	4
3.2 Spektrofotometrin rakenne	4
4 Menetelmien periaatteet	6
4.1 Raudan määrittäminen TPTZ-menetelmällä	6
4.2 Hach-Lange 265 Ferrover	6
4.3 Hach-Lange 270 TPTZ	7
5 Validointi	7
5.1 Validointi	7
5.2 Toistettavuus	8
5.3 Määrittämis- ja toteutamisraja	9
5.4 Tarkkuus ja systemaattinen virhe	10
5.5 Mittausalue, lineaarisuus ja herkkyys	11
5.6 Mittausepävarmuus	12
5.6.1 Yleistä mittausepävarmuudesta	12
5.6.2 Satunnaisvirheen laskeminen rinnakkaisnäytteistä	12
5.6.3 Standardeista johtuva epävarmuus	13
5.7 Menetelmien välinen systemaattinen ero	13
KOKEELLINEN OSA	15
6 Työn tarkoitus ja tavoitteet	15
7 Käytetyt laitteet ja reagenssit	15
7.1 Laitteet ja välineet	15

7.2 Reagenssit	15
8 Menetelmät	16
8.1 SFS 3028	16
8.1.1 Näytteiden esikäsittely, hapetus ja analysointi	16
8.1.2 Kalibrointisuoran valmistus	17
8.2 Hach-Lange 265	17
8.3 Hach-Lange 270 TPTZ	17
9 Työn kulku	18
9.1 SFS 3028	18
9.2 Hach-Lange 270	19
10 SFS 3028 -menetelmän validointi	19
10.1 Menetelmän toistettavuus	19
10.2 Menetelmän määrittämis- ja toteutamisrajat	20
10.3 Menetelmän systemaattinen virhe	20
10.4 Menetelmän mittausalue, herkkyys ja lineaarisuus	20
10.5 Menetelmän epävarmuus	21
10.5.1 Näytteet, joiden pitoisuus alle 250 µg/l	22
10.5.2 Näytteet, joiden pitoisuus yli 250 µg/l	22
10.6 SFS 3028 -menetelmän ja Hach-Lange 265 -menetelmän systemaattinen ero	23
11 Yhteenveto	23
11.1 Tulosten yhteenveto	23
11.2 Pohdinta	24
Lähteet	25
Liitteet	
Liite 1. Lineaarisuus: Standardisuorat	
Liite 2. Toistettavuus	
Liite 3. SFS 3028:n ja Hach-Lange 265:n menetelmien vertailu	

1 Johdanto

Tämän insinööriyön tavoitteena on ottaa käyttöön ja validoida SFS-standardin mukainen fotometrinen menetelmä veden raudan määrittämiseen Porvoon elintarvikelaboratoriossa. Laboratoriossa on ollut tähän asti käytössä Hach-Langen kyvettitesti. Tämä pikatesti on toimiva ja helppo menetelmä raudan määrittämiseen, mutta ei ota huomioon esimerkiksi orgaaniseen aineeseen sitoutunutta rautaa kuten SFS 3028 –menetelmä huomioi. Hach-Langen menetelmän määrittäysraja on tällä hetkellä rautaa 50 µg/l. Tavoitteena on saada määrittäysraja alemmaksi SFS 3028 -menetelmän myötä. Menetelmälle tehdään myös menetelmäohje.

Rautaa tutkitaan vedestä, koska se aiheuttaa korkeina pitoisuuksina teknis-esteettisiä ongelmia, kuten veden maussa ja värissä muutoksia sekä tekstiilien värjäytymistä. Veden rauta ei kuitenkaan ole vaarallista ihmisille. Rauta kuuluu laatusuosituksien alaisiin metalleihin ja raudan enimmäismäärälle on annettu talousvesiasetuksessa suositusraja-arvo 200 µg/l. [2; 3, s. 53]

Porvoon elintarvikelaboratorio on FINAS-akkreditoitu testauslaboratorio, jonka laatujärjestelmä kattaa ISO 17025 -standardin asettamat vaatimukset. Laboratorio tuottaa palveluitaan kuntalaisille, yrityksille, yhteisöille sekä asiantuntija- ja tutkimuspalveluita viranomaisille. Porvoon elintarvikelaboratorion toiminta-alue on Itä-Uusimaa. Elintarvikelaboratorion tutkittaviin näytteisiin kuuluvat muun muassa elintarvikkeet, uima-, kaivo- ja verkostovedet ja eläinten kliiniset näytteet. [1]

KIRJALLINEN OSA

2 Rauta vedessä

2.1 Esiintyminen

Suomessa rautaa esiintyy vesissä erityisen runsaasti Pohjanmaan rannikoilla, Ylivieskan-Haapajärven alueella ja Lounais-Suomen rannikkoalueilla. Rautaa on keskimääräisesti yli talousvesiasetuksen raja-arvon kaivoissa ja pohjavesissä. Raudan esiintymiseen pohjavedessä vaikuttavat suuresti veden hapetus-pelkistysolosuhteet sekä pH. Pohjaveteen liukenee rautaa maa- ja kallioperästä. Raudan liukenemista pohjaveteen tapahtuu useilla eri mekanismeilla. Näitä mekanismeja ovat hydrolyysi, hydraatio sekä hapetus-, pelkistys- ja ioninvaihtoreaktiot. Hydrolyysi on kemiallinen reaktio, jossa veden osallistuminen aiheuttaa yhdisteen hajoamisen. Hydraatioissa vesimolekyyli adsorboituu mineraalin pintaan ja sitä kautta pääsee mineraaliaineksen hilarakenteeseen. [3, s. 87; 7, s. 12]

Pohjavedessä rauta voi esiintyä pelkistyneessä muodossa liukoisena kahdenarvoisena rautana (Fe^{2+}). Vesissä esiintyy myös kolmenarvoista rautaa silloin, kun vesi sisältää happea. Vedessä oleva rauta reagoi hapen kanssa muodostaen niukkaliukoisia hydroksideja ja oksideita. Rauta(III)hydroksidi eli ferrihydroksidi ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) on yksi esimerkki raudan niukkaliukoisista hydroksideista, joita muodostuu hapen vaikutuksen avulla vedessä. Rauta reagoi myös herkästi vedessä olevien humusaineiden kanssa muodostaen kelaatin, joka on hyvin pysyvä kompleksi. [7, s. 12; 3, s. 53]

Rautasaostumia muodostuu vesijohtoputkissa korroosiotuotteiden ja verkostoveden yhdisteistä. Syntyviä yhdisteitä voivat olla esimerkiksi Fe_3O_4 ja FeOOH . pH:n muutosten ja korroosion yhteisvaikutuksesta syntyy rauta(II)karbonaattia (FeCO_3). Korroosiossa raudan syöpyessä muodostuva Fe^{2+} (ferrorauta) ei esiinny yksinään vedessä, ja se muodostaa negatiivisesti varautuneen ionin kanssa (esimerkiksi bikarbonaatti, sulfaatti, hydroksyyli-ioni) yhdisteen. Lepidokriitti (FeOOH) ja goethiitti (FeOOH) kuuluvat raudan oksihydroksidien ryhmään. Luonnossa lepidokriittiä esiintyy siellä, missä vedessä oleva rauta(II) hapettuu nopeasti ja hiilidioksidiä on läsnä vain vähän tai ei ollenkaan. Hitaan hapettumisen tuloksena syntyy goethiittia, ja kiteytymisprosessin yhteydessä

hiilidioksidin määrän kasvaessa goethiitin osuus kasvaa ja lepidokriitin osuus pienenee. [19, s. 81–81, 90]

Raudan esiintyminen karheilla pinnoilla edistää mikrobiologisen liman kehittymistä, joka koostuu rautabakteereista. Tämä lima voi vaikuttaa veden virtaukseen putkistoissa. Rautabakteerit voivat myös kasvaa porausreikien seinämissä, tukkia sisäänottoseulat ja vahingoittaa uppopumppuja. [8, s. 191–192]

2.2 Talousveden rauta

Talousvedellä tarkoitetaan muun muassa sellaista vettä, jota käytetään taloudessa vähintään 10 m³ päivässä tai vähintään 50 hengen tarpeisiin. Talousveden tulee täyttää talousvesiasetuksen vähimmäisvaatimukset eikä se saa aiheuttaa haitallista syöpymistä tai haitallisten saostumien syntymistä vesijohdoissa. Talousvesiasetus määrittää raudan suositusraja-arvoksi 0,2 mg/l. [2]

Talousvesiasetuksen seitsemäs momentti kertoo talousveden laadun säännöllisestä valvonnasta. Säännölliseen valvontaan sisältyy jatkuva valvonta sekä jaksoittainen seuranta. Jatkuvan valvonnan tarkoituksena on hankkia säännöllisesti tietoa veden laatuvaatimusten täyttymisestä. Jaksoittaisella seurannalla selvitetään, täyttääkö talousvesiasetuksen vaatimukset ja suositukset. Rauta kuuluu niihin aineisiin, joita seurataan jatkuvassa valvonnassa. [2]

Vedessä oleva rauta ei ole vaarallista ihmisille, mutta korkeina pitoisuuksina se aiheuttaa esteettisyyshaittoja ja teknisiä ongelmia. Makuhäiriöitä ja tekstiilien värjäytymistä ilmenee veden sisältäessä rautaa 0,3 mg/l, ja rautabakteereiden aiheuttamia ruostevärisiä saostumia ilmenee jo 0,05 mg/l rautapitoisuuksilla. Suositusraja-arvo 0,2 mg/l perustuu teknis-esteettisten haittojen ehkäisyyn. [3, s. 53]

3 Spektrofotometria

3.1 Menetelmän periaate

Spektrofotometriassa mitataan näytteen läpi kulkevan valon adsorptiota. Menetelmä on tavallisimpia kvantitatiivisiin analyysihin käytettyjä menetelmiä sen hyvien puolien vuoksi. Spektrofotometria on nopea ja tarkka menetelmä, ja sillä voi määrittää pieniäkin pitoisuuksia. Menetelmä perustuu empiiriseen Lambert-Beerin lakiin. Lambert-Beerin lain mukaan sähkömagneettisen säteilyn absorboituminen on riippuvainen aineen konsentraatiosta eksponentiaalisesti. Alla esitetystä kaavasta nähdään lineaarinen yhteys absorbanssin ja aineen pitoisuuden välillä.

$$A = \epsilon b C = -\lg T \quad (1)$$

A = absorbanssi

ϵ = molaarinen absorptiokerroin

b = säteilyn aineessa kulkema matka (kyvetin paksuus)

C = absorboivan aineen konsentraatio

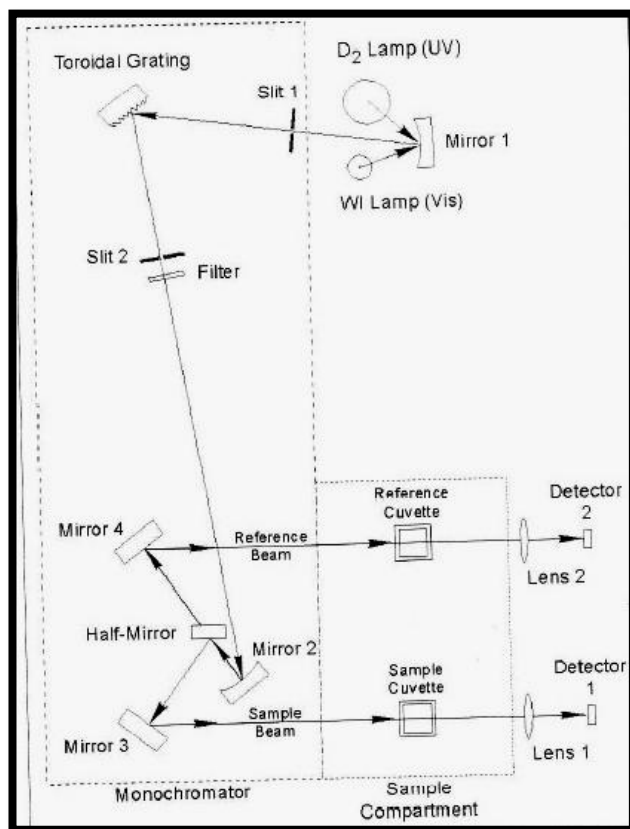
Kvantitatiivista analyysiä tehdessä verrataan tunnettujen standardien antamia absorbanseja näytteen antamaan absorbanssiin, jolloin näytteen konsentraatio saadaan selville.

3.2 Spektrofotometrin rakenne

Spektrofotometrissa löytyvät seuraavat rakenneosat: valolähde, monokromaattori, kyveti, detektori ja tulostin. Valolähteen tehtävänä on tuottaa voimakasta polykromaattista (näkyvää tai UV) valoa. Monokromaattori erottaa siihen tulevasta polykromaattisesta valosta monokromaattista valoa tietyllä aallonpituudella. Kyveti sisältää analysoitavaa absorboivaa yhdistettä, detektorin tehtävänä on havaita kyvetin läpi kulkenut valo ja muuttaa se sähköiseksi signaaliksi. [9, s. 114; 10, s. 450, 454]

Yksisädespektrofotometrit soveltuvat kvantitatiiviseen työskentelyyn ja niiden mittausperiaate on yksinkertainen. Ensin mitataan ns. referenssimittaus eli pelkkää liuotinta sisältävä kyveti. Referenssimittauksen jälkeen mitataan näyteliuos. [10, s. 445]

Kaksisädespektrofotometrissä on samat osat kuin yksisädespektrofotometrissä, poikkeuksena katkoja tai puoliläpäisevä peili, jonka tarkoituksena on ohjata monokromaattinen valonsäde vuorotellen näyte- ja referenssikyvatin läpi. Laite laskee valmiiksi absorbanssin A ja ilmoittaa sen. Kuvassa 1 on esitetty Hitachin kaksisädespektrofotometrin yleinen rakennekuva, josta näkee valon kulkeutumisen spektrofotometrissä. [10, s. 446; 11, s. 3]



Kuva 1. Kaksisädespektrofotometrin Hitachi Model U-2001 optinen kaavio [11]

4 Menetelmien periaatteet

4.1 Raudan määrittäminen TPTZ-menetelmällä

SFS 3028 -menetelmällä määritetään veden kokonaisrautapitoisuus. Menetelmä sopii luonnonvesien ja vähäisessä määrin likaantuneiden vesien kokonaisrautapitoisuuden määrittämiseen. Määritettäessä kokonaisrautapitoisuutta on tärkeää saada kaikki rauta reagoivaan muotoon. Vesinäytteen rauta saadaan ionimuotoon keittämällä näytettä paineen alaisena happamissa olosuhteissa. Hapettaminen poistaa myös orgaanisen aineksen sekä useimmiten näytteen oman värin, jotka voivat häiritä määrittystä.

Hapetuksen jälkeen kolmenarvoinen rauta (Fe^{3+}) pelkistetään hydroksyyliammoniumkloridilla kahdenarvoiseksi raudaksi (Fe^{2+}). pH:n ollessa 3,4 – 5,8 muodostaa kahdenarvoinen rauta TPTZ:n (2,4,6-tri(2-pyridyyli)-1,3,5-triaziinin) kanssa violetin kompleksin $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{2+}$. Tämän kompleksin absorbanssi mitataan spektrofotometrillä aallonpituudella 593 nm.

Määrittystä voivat häiritä kupari, koboltti ja nikkeli, jotka muodostavat värillisiä kompleksiyhdisteitä TPTZ-reagenssin kanssa. Suhteellinen virhe on kuitenkin pienempi kuin +2 %, kun kuparipitoisuus on alle 2,5 mg/l, kobolttipitoisuus alle 2,4 mg/l ja tai nikkelipitoisuus alle 5,3 mg/l. Muita määrittystä häiritseviä metalleja ovat sinkki, hopea, elohopea, vismutti sekä molybdeeni. [4, s. 1-2]

4.2 Hach-Lange 265 Ferrover

Ferrover-rautareagenssi muuttaa kaiken liukoisen raudan ja suurimman osan raudan liukenemattomista muodoista liukoiseksi rauta(II):ksi. Värireagenssina toimii 1,10-fenantroliini, joka muodostaa kahden arvoisen raudan kanssa oranssin kompleksin $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$. Näytteet mitataan Hach-Langessa valmiiksi olevia kalibroitaisuuksia vastaan aallonpituudella 510 nm. [6, s. 5; 9, s. 115]



Määrittystä häiritsevät korkeina pitoisuuksina Ca^{2+} -ioni (yli 10 000 mg/l), Cl^- -ioni (pitoisuudet yli 185 000 mg/l), magnesium (yli 100 000 mg/l) sekä sulfidi. Kahdenarvoinen

kupari ei häiritse määrittystä, koska Ferrover-reagenssi sisältää peittävää ainetta. [6, s.3]

4.3 Hach-Lange 270 TPTZ

Menetelmällä määritetään kokonaisrautapitoisuus. Menetelmän mitta-alue on 0,012 – 1,800 mg/l rautaa vedessä. Näytteet hapetetaan Hach-Langen hapetushauteessa happamissa olosuhteissa reagoivaan muotoon. TPTZ-pussin sisältämä reagenssi muodostaa tumman sinivioletin värin kahdenarvoisen raudan kanssa. Reagenssipussin indikaattori sisältää ainetta, joka muuttaa saostuneen ja suspentoituneen raudan ionimuotoon. Näytteet mitataan Hach-Langessa valmiiksi olevia kalibrointisuoria vastaan aallonpituudella 590 nm. [5, s. 1,4]

Määrittystä häiritseviä aineita ovat kadmium, kromi³⁺, kromi⁶⁺, koboltti, kupari, syanidi, mangaani, elohopea, molybdeeni, nikkeli ja nitriitti-ioni. Nämä tekijät vaikuttavat värin muodostukseen inhiboivasti tai kiihdyttävät muodostumista. Määrittäykseen vaikuttaa myös näytteen pH, jonka tulee olla 3-4 välillä reagenssin lisäämisen jälkeen. Muutoin värin muodostuminen voi hidastua, aiheuttaa värin haalentumisen tai tehdä näytteen sameaksi. [5, s. 3]

5 Validointi

5.1 Validointi

Menetelmän validoinnilla tarkoitetaan prosessia, jolla määritetään analyttiset vaatimukset ja varmistetaan menetelmän soveltuvuus käyttötarkoitukseensa. On tärkeää selvittää menetelmän toimivuus käytettävillä välineillä ja laitteistoilla. Käytettävien välineiden tulee olla toimivia ja asiaankuuluvasti kalibroituja. Validointi on välttämätöntä siksi, että testituloksiin täytyy pystyä luottamaan. Tulos ja tuloksen epävarmuus tulee pystyä ilmoittamaan tietyllä luottamusalueella. Suurin osa epävarmuuden laskemista varten tarvittavasta tiedosta saadaan menetelmää validoidessa. [13, s. 3 – 4]

5.2 Toistettavuus

Toistettavuus on osa kokonaisuutta, jolla mitataan menetelmän täsmällisyyttä. Toistettavuus kertoo, kuinka yhtäpitäviä mittatulokset ovat, kun mittauksia tehdään samalla menetelmällä lyhyellä aikavälillä. Toistettavuuden mittaamiseen ei vaikuta, tekeekö kokeet sama vai eri tekijä, samoilla vai eri mittauslaitteilla samassa laboratoriossa. Toistettavuutta voidaan arvioida varianssianalyysin avulla. Kokonaisvarianssi s_t^2 (kokonaihajonta) on sarjan sisäisen varianssin s_w^2 ja sarjojen välisen varianssin s_b^2 summa. [12, s. 40 – 41]

$$s_t^2 = s_w^2 + s_b^2 \quad (4)$$

Toistettavuutta arvioidessa täytyy huomioida, millaisia ja kuinka useita näytteitä tutkitaan. Näytteen pitoisuudella voi olla huomattava vaikutus toistettavuuskokeiden tuloksiin. Jotta menetelmän toistettavuudesta saadaan mahdollisimman laaja käsitys, tulee toistokykymittauksia tehdä useissa eri pitoisuuksissa. Menetelmän toistettavuusmittauksia voidaan tehdä yhdessä tai useammassa sarjassa. Toistettavuusmittauksien tulokset huononevat, mitä pidemmällä aikavälillä mittaukset tehdään. Testattavien näytteiden tulee olla homogeenisiä keskenään. Toistettavuutta on hyvä mitata standardejen lisäksi myös näytteistä. [12, s. 41]

Toistettavuuskokeiden tuloksien tilastollisessa käsittelyssä lasketaan sarjan sisäinen hajonta s_w , sarjojen välinen hajonta s_b sekä kokonaihajonta s_t . Varianssianalyysi voidaan esittää alla olevalla tavalla.

$$SS_1 = \left(\frac{\sum B^2}{n} \right) - \frac{(\sum B)^2}{mn} , \text{ sarjojen välisen vaihtelun neliösumma} \quad (4)$$

$$SS_0 = \sum X^2 - \frac{\sum B^2}{n} , \text{ sisäisen vaihtelun neliösumma} \quad (5)$$

$$N_1 = m - 1 , \text{ sarjojen välisen vaihtelun vapausaste} \quad (6)$$

$$N_0 = m(n - 1) , \text{ sisäisen vaihtelun vapausaste} \quad (7)$$

$$M_1 = \frac{SS_1}{N_1} , \text{ sarjojen välinen MS, sarjan sisäinen ja sarjojen välinen vaihtelu.} \quad (8)$$

$$M_0 = \frac{SS_0}{N_0} , \text{ sarjan sisäinen MS-arvo, sisältää arvion sarjan sisäisestä varianssista.} \quad (9)$$

jossa

m = sarjojen lukumäärä

n= rinnakkaisten lukumäärä

ΣB = sarjan rinnakkaistulosten summa

ΣB^2 = summan neliö

X^2 = yksittäisen tuloksen neliö

\bar{x} = tulosten keskiarvo

MS-termejä (M_1 ja M_0) verrataan toisiinsa, jotta saadaan arvio sarjojen välisen hajonnan merkitsevyydestä. Alla on esitetty, miten sarjan sisäinen hajonta s_w , sarjojen välinen hajonta s_b , varianssisuhde F , kokonaishajonta s_t ja suhteellinen hajonta $s(\%)$ lasketaan.

$$s_w^2 = M_0 \rightarrow s_w = \sqrt{M_0} \quad (10)$$

$$s_b^2 = \frac{(M_1 - M_0)}{n} \quad (11)$$

$$F = \frac{M_1}{M_0} \quad (12)$$

$$s_t^2 = s_b^2 + s_w^2 = \frac{M_1 + (n-1)M_0}{n} \rightarrow s_t = \sqrt{\frac{M_1 + (n-1)M_0}{n}} \quad (13)$$

$$s(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \quad (14)$$

Kun $F_{\text{laskettu}} < F_{\text{teoreettinen}}$ halutulla todennäköisyydellä, ei sarjon välinen hajonta s_b ole merkitsevä. Jos $M_1 < M_0$, tulee ensin laskea F -arvo, ja jos laskettu F -arvo on pienempi kuin kriittinen F -arvo, on silloin $s_b^2 \approx 0$ ja $s_w^2 = M_0$. Jos $F_{\text{laskettu}} > F_{\text{teoreettinen}}$, tulee menetelmä tarkastaa poikkeavien virhelähteiden selvittämiseksi. [12, s. 42–45]

5.3 Määritys- ja toteamisraja

Toteamisraja (limit of detection) määritellään pitoisuudeksi, jolla voidaan todeta, onko näytteessä määritettävää yhdistettä vai ei. Myös toteamisrajan tulee erota nollanäytteen arvosta merkittävästi. Toteamisraja arvioidaan yleensä 95 % todennäköisyydellä. Nollanäytteiden tulee noudattaa normaalijakaumaa. Arvio toteamisrajasta saadaan alla olevasta kaavasta.

$$\text{Toteamisraja} = \mu_B + 3s \quad (15)$$

Määritysraja (limit of determination, limit of quantitation) ilmaisee pitoisuuden, joka voidaan määrittää hyväksyttävällä tarkkuudella ja täsmällisyydellä. Määritysraja ilmaistaan yleensä tilastollisella todennäköisyydellä, jolloin näytteen konsentraatio poikkeaa

merkitsevästi nolasta. Määritysraja voidaan arvioida joko nollanäytteiden tai lähellä määritysrajaa olevalla standardiliuoksella. Nollanäytteistä määritysraja voidaan laskea alla olevalla kaavalla 13, jossa μ_B nollanäytteen tulosten keskiarvo ja s nollanäytteen tulosten keskihajonta.

$$\text{Määritysraja} = \mu_B + 5s, 6s \text{ tai } 10s \quad (16)$$

Kun nollanäytteiden rinnakkaismittaukset tehdään pidemmällä aikavälillä, lasketaan keskihajonta nollanäytteiden rinnakkaismittausten erotuksesta. Määritysrajan laskemisessa voidaan tässä tapauksessa käyttää arviota $4,65s$, kun määritysten lukumäärä on riittävän suuri. [12, s. 29 - 30]

$$s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2m}} \quad (17)$$

$$\text{Määritysraja} = 2\sqrt{2}t_{0,05}s \quad (18)$$

Kaavassa d = nollanäytteiden erotus (pitoisuus), m = näytesarjojen lukumäärä.

5.4 Tarkkuus ja systemaattinen virhe

Tarkkuus on käsite jota käytetään, kun menetelmällä halutaan tietää näytteiden todelliset konsentraatiot ja kun halutaan vertailla eri laboratorioiden tuloksia toisiinsa. Tarkkuus rinnastetaan helposti kokonaisvirheeseen, koska tarkkuuteen vaikuttavat systemaattisen virheiden ja satunnaisvirheiden esiintyminen. Systemaattinen virhe näkyy määrittämisessä, kun saatu tulos on suurempi tai pienempi kuin näytteen todellinen arvo. Virhe β on määritelty seuraavalla tavalla:

$$\beta = X - \mu \quad (20)$$

Kaavassa X on määrittämällä saatu tulos, esimerkiksi usean määrittämisarvon keskiarvo, ja μ on näytteen todellinen arvo. Systemaattisen virheen esiintymiseen vaikuttavat esimerkiksi nollanäytteen arvioinnin ja kalibroinnin virheellisyys, määrittämisolosuhteet sekä näytteen muuttuminen ennen analysointia.

Menetelmän tarkkuus määritellään testituloksen ja hyväksytyn vertailuarvon välisen eron suuruutena. Tarkkuuteen vaikuttaa systemaattisten ja satunnaisvirheiden esiintyminen. Tarkkuus ilmoitetaan yleensä todellisen tai odotetun arvon poikkeamana näytteen arvosta ja ilmoitetaan useimmiten prosentteina. Tarkkuuden arviointiin voidaan käyttää myös t-testiä, kun tuloksia verrataan toisella menetelmällä saatuihin tuloksiin. Tarkkuus-% ja t-testin kaavat löytyvät alta. [12, s. 33–34]

$$Tarkkuus - \% = \frac{100(X-\mu)}{\mu} \quad (21)$$

$$t = \frac{|\bar{x}-\mu|}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad (22)$$

5.5 Mittausalue, lineaarisuus ja herkkyys

Mittausalueella tarkoitetaan sitä arvojoukkoa, jolloin mittauslaitteen virhe pysyy määritetyissä rajoissa. Analyttisessä kemiassa menetelmän mittausalueella tarkoitetaan yleensä lineaarista mittausaluetta. Analyysimenetelmän luotettava mittausalue on yleensä laajempi kuin lineaarinen alue.

Lineaarisuus kertoo tulosten ja tutkittavan aineen pitoisuuden välisestä korrelaatiosta. Menetelmä on lineaarinen, kun tämä korrelaatio on hyväksyttävissä rajoissa. Lineaarisuutta määritettäessä suositellaan käytettäväksi vähintään viittä eripitoista standardia, joiden pitoisuudet kattavat vaadittavan mittausalueen. Eri pitoisuuksista tulisi suorittaa useampia toistoja. Tuloksien perusteella piirretään regressiosuora käyttämällä pienimmän neliösumman menetelmää. Piirretystä suorasta voidaan silmämääräisesti arvioida menetelmän lineaarinen alue.

Menetelmän kykyä havaita näytepitoisuuksien pienet vaihtelut kutsutaan herkkyydeksi. Jos menetelmä noudattaa lineaarista kalibrintia, kertoo kalibrintisuoran kulmakerroin b menetelmän herkkyyden. Menetelmää kutsutaan herkäksi, jos pieni muutos pitoisuudessa aiheuttaa suuren muutoksen laitteen vasteessa.

[14, s. 28–29; 12, s. 28]

5.6 Mittausepävarmuus

5.6.1 Yleistä mittausepävarmuudesta

SFS 3700 määrittelee mittausepävarmuuden parametriksi, jolla kuvataan mittaussuuren arvojen oletettua vaihtelua. Parametrina voi toimia esimerkiksi keskihajonta s tai sen monikerta. Mittausepävarmuus kertoo ne rajat, joiden sisällä mittaustulokset ovat halutulla todennäköisyydellä. Mittausepävarmuus koostuu yleensä useista osista, ja näitä osia voidaan arvioida ja kuvata useimmiten kokeellisen keskihajonnan avulla. Kaikki epävarmuustekijät vaikuttavat mittaustulokseen. Vaikuttavia tekijöitä ovat esimerkiksi näytteenotto, olosuhteet, pipetointiin ja punnitukseen liittyvä epävarmuus sekä satunnaisvaihtelu. Mittaustuloksen tarkkuuden riittävyttä arvioitaessa ovat mittausepävarmuustiedot ratkaisevia. [14, s. 18–19]

MIKES jakaa mittausepävarmuusarvioiden tekemisen kahteen tyyppiin. Tyypin A mittausepävarmuusarvio lasketaan tilastollisia menetelmiä käyttäen. Tyypin B mittausepävarmuus tehdään muilla kuin tilastollisilla analyyseillä (kirjallisuustiedot, valmistajan ilmoittamat arvot). [15, s. 8]

Kokonaismittausepävarmuus u_{tot} on neliöjuuri kaikista mittausepävarmuuksista.

$$u_{tot} = \sqrt{\sum U_i^2} \quad (23)$$

Laajennettu epävarmuus saadaan kertomalla kokonaisepävarmuus kahdella. Peittävyyskerroin 2 vastaa likimain 95 % luotettavuusväliä, eli ilmoitettujen rajojen välillä on noin 95 % tuloksista.

$$U = 2 * u_{tot} \quad (24)$$

[14, s. 18–19; 15, s. 8]

5.6.2 Satunnaisvirheen laskeminen rinnakkaisnäytteistä

Satunnaisvirheen voi laskea rinnakkaismääritysten avulla. Satunnaisvirhettä voidaan kuvata keskihajonnalla s_r .

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum (a_i - b_i)^2}{2 * n}} \quad (25)$$

jossa $a - b$ on rinnakkaisnäytteiden erotus ja n näytteiden lukumäärä.

Kun näytteiden konsentraatioissa on suuria eroja, tapahtuu suhteellisen keskihajonnan ($RSD_r(\%)$) laskeminen alla olevalla tavalla. [16, s. 17–18]

$$RSD_r(\%) = \sqrt{\frac{\sum d_i^2}{2 \cdot n}} \quad (26)$$

$$\text{Kaavassa } d_i = \frac{(a_i - b_i)}{\bar{x}_i} * 100 \quad (27)$$

5.6.3 Standardeista johtuva epävarmuus

Standardeista johtuva epävarmuuskomponentti lasketaan suhteellisella epävarmuuskomponentti $RSD(\%)$:llä ($RSD(\%)$ = Relative standard deviation). [16, s. 11]

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (28)$$

5.7 Menetelmien välinen systemaattinen ero

Kahden eri menetelmän välistä systemaattista eroa voidaan tutkia vertaamalla usean erillisen näytteen tulosta toisiinsa. T-testillä tutkitaan eroavatko menetelmien 1 ja 2 tulokset toisistaan tilastollisesti vai ovatko saadut tulokset yhtä suuria. T-testi antaa luotettavan tuloksen, kun tulosparien erotukset jakautuvat normaalisti. T-testin tulosta verrataan taulukkoon, josta saadaan teoreettinen arvo t-testille halutulla merkitsevyystasolla. Jos laskettu t-arvo on pienempi kuin teoreettinen arvo, voidaan todeta, ettei menetelmillä ole eroa valitulla merkitsevyystasolla. Alla on esitetty vaiheittain, miten menetelmien välinen systemaattinen ero lasketaan. [12, s. 63–64]

Menetelmiä 1 ja 2 verrataan määrittämällä y määrä näytteitä molemmilla menetelmillä. Tuloksista lasketaan keskiarvo d_x ja varianssi s_d^2 .

$$d_x = \frac{\sum d_i}{n} \quad (29)$$

$$s_d^2 = \frac{\sum d_i^2 - (\sum d_i)^2 / n}{n - 1} \quad (30)$$

joissa

$$d_i = x_1 - x_2$$

n = tulosparien lukumäärä

t-testin arvo saadaan alla olevasta kaavasta:

$$t = \frac{d_x}{\sqrt{\frac{s_d^2}{n}}} = \frac{d_x \sqrt{n}}{s_d} \quad (31)$$

KOKEELLINEN OSA

6 Työn tarkoitus ja tavoitteet

Työn tarkoituksena oli validoida ja ottaa käyttöön SFS-standardin mukainen menetelmä SFS 3028 raudan määrittämiseen vesinäytteistä. Tällä hetkellä laboratoriossa on käytössä Hach-Langen pikakyvettitesti. SFS 3028:n ja Hach-Langen pikakyvettitestin suurin ero on se, ettei pikatesti ota huomioon sitoutunutta rautaa. SFS 3028 -menetelmä on monimutkaisempi ja hitaampi menetelmä kuin pikatesti, minkä takia sitä ei ole aiemmin otettu käyttöön laboratoriossa. Nykyisen Hach-Lange-pikamenetelmän määrittäysraja on 50 µg/l ja tavoitteena oli saada määrittäysrajaksi 20 µg/l.

Muita tavoitteita oli testata raudan määrittäminen toisella Hach-Langen tarjoamalla menetelmällä. Tämä menetelmä mittaa kokonaisrautaa (Hach-Lange 270 TPTZ). Menetelmässä näytteet hapetetaan Hach-Langen hapetushauteessa, minkä jälkeen lisätään TPTZ-reagenssipussi hapetettuun näytteeseen ja se mitataan Hach-Langen spektrofotometrillä.

7 Käytetyt laitteet ja reagenssit

7.1 Laitteet ja välineet

SFS 3028 -näytteet mitattiin UV/VIS kaksisädespektrofotometrillä Hitachi U-2001, kyvetteinä käytettiin 50 mm:n kvartsikyvettejä. Hach-Lange-menetelmien näytteet mitattiin Hach-Lange DR 2800 -spektrofotometrillä. SFS 3028 -menetelmää varten happeksiin lasiset hapetuspullot ja standardeissa käytettävät mittapullot sekä reagenssejen säilytyspullot. Happopesussa puhtaita astioita pidetään 24 tuntia 2 M HCl-liuoksessa, minkä jälkeen astiat huuhdellaan hyvin tislatusella vedellä. Happopesun tarkoituksena on poistaa lasiastioiden seinämiin adsorpoitunut rauta.

7.2 Reagenssit

Käytetyt reagenssit olivat vähintään analyysipuhdasta laatua. Taulukossa 1 on esitetty työssä käytetyt reagenssit menetelmien mukaan jaoteltuna.

Taulukko 1. Käytetyt reagenssit

Reagenssi	Pitoisuus
SFS 3028	
Rikkihappo (H_2SO_4)	4 mol/l
Kaliumperoksisulfaatti ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)	
Hydroksyyliammoniumkloridiliuos (HONH_3Cl)	0,001 mol/l
TPTZ-liuos ($\text{C}_3\text{N}_3(\text{C}_5\text{H}_4\text{N})_3$)	3 mol/l
Natriumasetaattiliuos ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Fe 100 mg/l
Rautastandardin perusliuos	Fe 2 mg/l
Rautastandardin työliuos	
Hach-Lange 270 TPTZ	
LCW 902 A (rikkihappo)	40 %
LCW 902 B (kaliumperoksisulfaatti)	
Puskuriliuos LCW 903 C (natriumhydroksidi)	
TPTZ-reagenssipussi	
Hach-Lange 265	
Ferrover-reagenssipussi	

8 Menetelmät

8.1 SFS 3028

8.1.1 Näytteiden esikäsittely, hapetus ja analysointi

Kestävöintiä varten 100 ml:aan näytettä lisätään 1 ml 4 mol/l rikkihappoa (H_2SO_4). Hapetuspulloon pipetoidaan 25,0 ml kestäväityä näytettä ja punnitaan $0,25 \pm 0,05$ g kaliumperoksisulfaattia ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Hapetuspullo suljetaan tiiviisti ja ravistetaan, kunnes suola liukenee näytteeseen. Näytettä keitetään autoklaavissa 30 minuuttia 200 kPa:n paineessa ja n. 120 °C:ssa. Näytteiden hapetuksen jälkeen näytteet jäädytetään huoneenlämpöiseksi. [4, s. 3]

Hapetettuun huoneenlämpöiseen näytteeseen lisätään 2,0 ml hydroksyyliammoniumkloridiliuosta, 2,0 ml TPTZ-liuosta ja 2,0 ml natriumasetaattiliuosta. Nollanäyte tulisi käsitellä kuten normaalit näytteet, mutta työn aikana todettiin, että on parempi käyttää täysin käsittelemätöntä tislattua vettä. Näytteet mitataan aikaisintaan 5 minuuttia viimeisestä reagenssista mutta viimeistään 2 tunnin kuluttua. Näytteen absorbanssi mitataan aallonpituudella 593 nm, referenssinä käytetään nollanäytettä. Kaikki näytteet

mitataan 50 mm:n kyvetissä. Näytteen rautapitoisuus lasketaan standardisuoran perusteella.

[4, s. 3]

8.1.2 Kalibrointisuoran valmistus

Kalibrointisuoraa varten valmistetaan rautastandardin työliuoksesta 100 ml:n mittapulloihin rautastandardit, jotka sisältävät rautaa 10, 20, 40, 100, 200, 500, 1000, 1500 µg/l. Rautaliuokset käsitellään samalla tavoin kuin näytteet. Kalibrointisuora piirretään siten, että se esittää rautastandardinäytteiden mitatut absorbanssit näytteiden sisältämän rautapitoisuuden funktiona. Suoran tulisi olla lineaarinen. [4, s. 3]

8.2 Hach-Lange 265

Näytettä pipetoitiin 25 ml näytekyvetiin, johon lisättiin Ferrover-reagenssipussi. Sekoitetaan hyvin ja annetaan reagoida 3 minuuttia. Nollanäyte valmistetaan tislatususta vedestä, joka käsitellään samoin kuin normaalit näytteet. Hach-Lange-spektrofotometri nollataan ennen jokaista näytettä nollanäytteellä. [6, s. 1-2]

8.3 Hach-Lange 270 TPTZ

Näytteen kestäväointi ja hapettaminen

Homogenisoitua näytettä mitataan reaktioputkeen 10 ml. Lisätään reaktiotuubiin 1 ml LCW 902 A -reagenssia (rikkihappo 40 %). Tarkistetaan, että pH < 1 reagenssi A:n lisäyksen jälkeen. Tarvittaessa lisätään rikkihappoa tipoittain, kunnes pH < 1. Lisätään 2 mittalusikallista (pakkauksen mukana) reagenssia LCW 902 B (kaliumperoksodisulfaatti). Suljetaan reaktiotuubi ja sekoitetaan. Näytettä lämmitetään hapetushauteessa 100 °C:ssa 60 minuuttia. Annetaan näytteen jäähtyä ja pipetoidaan 1 ml puskuriliuos C:tä (LCW 902 C) ja sekoitetaan. Tarkistetaan, että pH on välillä 2,5 – 5. [17]

Näytteen analysointi

Kestäväointi ja hapetettua näytettä otetaan reaktioputkesta 10 ml Hach-Langen näytekyvetiin. Näytekyvetiin lisätään TPTZ-rautareagenssipussin sisältö kokonaisuudessaan. Sekoitetaan 30 sekuntia, jotta reagenssi liukenee kunnolla. Nollanäytteenä käytetään tislattua vettä, johon myös lisätään TPTZ-reagenssipussi. Annetaan reagoida 3

minuuttia. Reaktioajan päätyttyä nollanäyte mitataan ja Hach-Lange nollataan. Nollanäytteen jälkeen mitataan näyte. Hach-Lange antaa näytteen rautapitoisuuden muodossa mg/l. [5, s. 1-2]

9 Työn kulku

9.1 SFS 3028

SFS 3028 -näytteitä tutkittiin hyvin pitkälti validointisuunnitelman mukaisesti. Näytteinä käytettiin verkostovesinäytteitä, kaivovesinäytteitä sekä kaivovesistä koostettuja näytteitä. SFS 3028 -menetelmällä määritettiin rinnakkaisnäytteitä, joista laskettiin menetelmien satunnaisvirhe. Toistokykyä varten määritettiin kahden näytteen pitoisuudet useina eri ajankohtina. Nollanäytteitä analysoitiin muiden näytteiden mukana, kun painekattilassa oli tilaa. Jokaisella mittauskerralla mukana oli vähintään yksi standardi ja sen rinnakkainen. SFS 3028 -menetelmällä sekä Hach-Lange 265 -menetelmällä analysoitiin useita eri näytteitä, joiden perusteella määritettiin, onko menetelmien välillä systemaattista eroa. Standardisuora tehtiin työn aikana kuusi kertaa.

Työn suoritus

Työ aloitettiin happopesussa olevien pipettien, hapetuspullojen sekä mittapullojen huuhtelulla. Astiat huuhdeltiin useaan kertaan tislatussa vedessä, minkä jälkeen hapetuspullot kuivattiin lämpökaapissa. Kuivauksen aikana valmistettiin standardit, joita otettiin mukaan ko. mittauskertaan mukaan. Hapetuspullojen kuivaamisen jälkeen edettiin työohjeen mukaisesti eli punnittiin hapetuspulloihin kaliumperoksidisulfaattia ja pipetoitiin näyte. Hapetuspullot suljettiin tiiviisti ja varmistettiin, että suola on liuenut. Näytettä keitettiin ohjeen mukaan painekattilassa. Näytteet jäähdytettiin ja niihin lisättiin reagenssit ohjeen mukaisesti, minkä jälkeen näytteet mitattiin spektrofotometrillä.

Työn edetessä huomattiin, että osa hapetuspulloista oli hyvinkin naarmuisia, minkä seurauksena tulokset heittelevät paljon alussa. Käytettyjä pulloja alettiin seurata tarkkaan, jolloin selvisi, että naarmuisissa pulloissa pitoisuudet vaihtelivat suuresti (esimerkiksi nollanäytteiden kohdalla tämä erottui selkeästi). Laboratorioon päätettiin tilata uusia pulloja, minkä jälkeen tulokset paranivat huomattavasti. Naarmuisten pullojen

tulokset hylättiin kokonaan laskuissa, vaikka osassa tapauksessa tulokset olisivat olleet hyviä. Lisäksi ongelmia tuotti spektrofotometrin kyvetistä löytynyt halkeama, joka aiheutti jonkin verran tuloksiin heittoa. Laboratorioon tilattiin myös uusi kyvettipari, minkä jälkeen tulokset tasaantuivat. Kyveti, jossa halkeama oli käytettiin aina referenssipaikalla samoin päin, jolloin tulokset olivat vertailukelpoisia keskenään.

9.2 Hach-Lange 270

Työn kulku

Tätä menetelmää tutkittiin toisena mahdollisuutena raudan määrittämiseen. Hapetushauke oli käytössä yhden viikon ajan, joten halutut testit piti tehdä nopeasti. Näytteet tehtiin aina rinnakkaisina, ja ne mitattiin myös Hach-Lange 265 –menetelmällä, jolloin tuloksia voitaisiin verrata. Työssä edettiin ohjeen mukaisesti. Reagenssi A:n lisäyksen jälkeen tarvitsi suurimman osan näytteistä pH:ta säätää alemmaksi reilusti. TPTZ-reagenssipussin lisäyksen jälkeen myös suurin osa näytteistä meni sameiksi ja mittauskelvottomiksi. Ne näytteet, jotka eivät menneet sameiksi, antoivat samansuuntaisia tuloksia Hach-Lange 265:n kanssa. Ajan vähyyden vuoksi todettiin, että menetelmällä ei kannata tehdä juuri nyt enempää testejä.

10 SFS 3028 -menetelmän validointi

10.1 Menetelmän toistettavuus

Toistettavuutta tutkittiin määrittämällä saman näytteen rautapitoisuus useampana eri päivänä. Toistettavuutta tutkittiin kahdella eri näytteellä, jotka molemmat olivat kaivo-vesistä koostettuja näytteitä. Molemmista näytteistä S1 ja S2 tehtiin kunakin päivänä rinnakkaismääritykset. S1-näytteestä tehtiin määritykset kymmenenä päivänä ja S2-näytteestä seitsemänä päivänä. Määrityksiä tehtiin aikavälillä 20.10.2010 – 26.01.2011. Taulukossa 1 on esitetty toistettavuusnäytteiden S1 ja S2 hajontojen s_w , s_b ja kokonaishajonnan s_t arviot sekä suhteelliset hajonnat.

Taulukko 2. Toistokykynäytteiden S1 ja S2 hajonnat.

S1		s (%)
Sarjan sisäinen hajonta s_w	32,1	0,054
Sarjojen välinen hajonta s_b	~0	
Kokonaishajonta s_t	30	0,050
S2		
Sarjan sisäinen hajonta s_w	8,9	0,05
Sarjojen välinen hajonta s_b	~0	
Kokonaishajonta s_t	11,3	0,07

S1-näytteiden pitoisuuden keskiarvo oli 592 µg/l ja S2-näytteiden pitoisuuden keskiarvo oli 173 µg/l. Hach-Langella saatiin S1-näytteen pitoisuudeksi 450 µg/l ja S2-näytteen pitoisuudeksi 150 µg/l. Sarjojen välisen hajonnan s_b ei katsota olevan merkitsevä kummankaan näytesarjan kohdalla, koska laskettu F-arvo oli pienempi kuin kriittinen F-arvo 5 %:n merkitsevyystasolla. Sarjan sisäinen vaihtelu vaikuttaa eniten keskiarvoon. Liitteessä 2 on esitetty graafisena sarjojen S1- ja S2-näytteiden pitoisuudet.

10.2 Menetelmän määrittämis- ja toteamisrajat

Menetelmän määrittämisraja ja toteamisrajan arviota varten määritettiin useita nollanäytteitä rinnakkaismittauksina, jotka käsiteltiin samoin kuin normaalit näytteet. Näytteet mitattiin pitkällä aikavälillä (10.11.2010 – 1.12.2010). Toteamisrajaksi saatiin 33 µg/l ja määrittämisrajaksi 37 µg/l. Toteamisrajan ja määrittämisrajan väliin jää harmaa alue, jolla voidaan luotettavasti todeta rautaa olevan, mutta sen määrän arviointi sisältää huomattavan epävarmuuden.

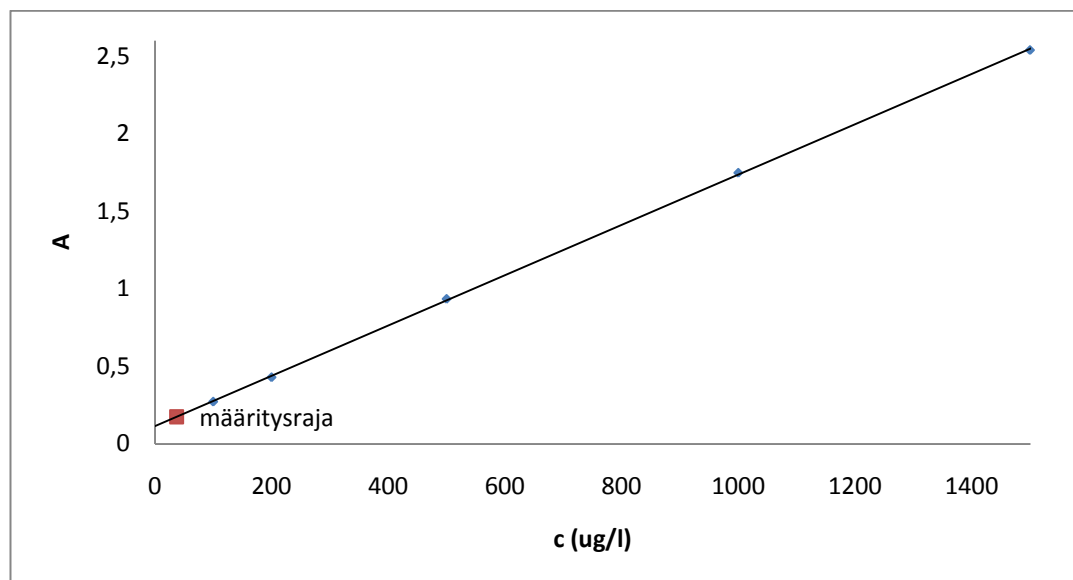
10.3 Menetelmän systemaattinen virhe

Menetelmän systemaattinen virhe selvitettiin määrittämällä standardinäytteitä kahdella eri pitoisuudella. Menetelmän systemaattiseksi virheeksi saatiin standardilla, joka sisältää 40 µg/l standardilla (44 näytettä) -2,70 % ja 200 µg/l rautaa sisältävällä standardilla (40 näytettä) 4,96 %.

10.4 Menetelmän mittausalue, herkkyys ja lineaarisuus

Menetelmän lineaarisuutta tutkittiin määrittämällä 6 eri standardinäytettä, joiden pitoisuudet ovat 40, 100, 200, 500, 1000, 1500 µg/l. Näistä tuloksista piirrettiin standar-

disuora, joka esittää standardiliuosten absorbanssin rautapitoisuuden funktiona. Kuvassa 2 on esitetty standardisuora, joka on kuuden eri standardisuoran keskiarvoista muodostettu. Kaikki työn aikana tehdyt standardisuorat on esitetty liitteessä 1 olevassa kuvaajassa.



Kuva 2. Standardisuora $y = 0,0016x + 0,1155$, $R^2 = 0,9999$

Taulukko 3. Standardisuoran absorbanssit

20 µg/l	0,149
40 µg/l	0,183
100 µg/l	0,273
200 µg/l	0,430
500 µg/l	0,935
1000 µg/l	1,747
1500 µg/l	2,537

Menetelmän voidaan todeta olevan lineaarinen hyvän selityssasteen perusteella pitoisuuksilla 40 µg/l – 1500 µg/l. Menetelmän mittausalueen alin piste on menetelmän määritysraja 37 µg/l ja ylin piste lineaarisuoran ylin piste 1500 µg/l. Menetelmän herkkydeksi saatiin 0,0016 µg/l.

10.5 Menetelmän epävarmuus

Menetelmän epävarmuuskomponentteja ovat standardin pitoisuuksien suhteellinen keskihajonta, menetelmän systemaattinen virhe ja rinnakkaisnäytteiden suhteellinen

keskihajonta. Epävarmuudet laskettiin näytteille, joiden pitoisuus on alle 250 µg/l, ja näytteille, joiden pitoisuus on yli 250 µg/l.

10.5.1 Näytteet, joiden pitoisuus alle 250 µg/l

Taulukossa 3 on esitetty alle 250 µg/l sisältävien näytteiden epävarmuuskomponentit ja näiden komponenttien summa U ja laajennettu epävarmuus U_{tot} , joka on epävarmuus alle 250 µg/l rautaa sisältäville näytteille. Alle 250 µg/l olevien näytteiden epävarmuus on kohtuuttoman suuri, ja se vaatii lisänäytteiden tekemistä. Näytteiden hajonta oli keskimäärin pientä, mutta yhden näytteen hajonta oli hyvin suuri, mikä aiheutti myös RSDr%:n nousemisen. Kyseisen näytteen poistaminen tuloksista aiheuttaisi kokonaisepävarmuuden putoamisen 22,15:een. Tuloksissa ei otettu huomioon näytteitä, jotka olivat alle määrittäysrajan. Rinnakkaisnäytteitä oli mukana 6 paria. 200 µg/l rautaa sisältävän standardin suhteellinen keskihajonta laskettiin 40 näytteen perusteella.

Taulukko 4. Epävarmuuskomponentit ja laajennettu epävarmuus U_{tot}

Std 200 RSD%	Syst.virhe	RSDr%	U	U_tot
8,93	-2,86	14,81	17,53	35,05

10.5.2 Näytteet, joiden pitoisuus yli 250 µg/l

Taulukossa 4 on esitetty yli 250 µg/l rautaa sisältävien näytteiden epävarmuuskomponentit sekä epävarmuus U ja siitä laskettu laajennettu kokonaisepävarmuus U_{tot} . Näytteiden epävarmuus on korkea, mutta sallituissa rajoissa. Epävarmuus laskee yleensä sitä mukaa, mitä enemmän näytteitä tehdään. Rinnakkaisnäytteitä oli mukana 9 paria. 500 µg/l rautaa sisältävän standardien suhteellinen keskihajonta laskettiin 8 näytteen perusteella.

Taulukko 5. Epävarmuuskomponentit ja laajennettu epävarmuus U_{tot}

Std 500 RSD%	Syst.virhe	RSDr%	U	U_tot
9,04	4,93	2,80	10,67	21,34

10.6 SFS 3028 -menetelmän ja Hach-Lange 265 -menetelmän systemaattinen ero

Menetelmien välistä systemaattista eroa tutkittiin mittaamalla molemmilla menetelmillä useita näytteitä. Taulukossa 5 on esitetty tulosparien erotusten keskiarvo d_x , varianssi s_d^2 , laskettu t-arvo sekä taulukosta saatu teoreettinen t-arvo. Koska laskettu t-arvo on pienempi kuin teoreettinen arvo, menetelmillä ei voida katsoa olevan systemaattista eroa 5 %:n merkitsevyystasolla. Liitteessä 3 on esitetty taulukossa SFS 3028 -menetelmän ja Hach-Lange 265 -menetelmän tuloksia. Taulukosta löytyy myös osalle näytteistä KMnO_4 -arvo sekä sameusmittauksen tulos.

Taulukko 6. Menetelmien välinen systemaattinen ero

d_x	s_d^2	t_{laskettu}	$t_{0,05}(12)$
171,28	2762	1,17	2,179

11 Yhteenveto

11.1 Tulosten yhteenveto

Määritysrajaksi saatiin 37 $\mu\text{g/l}$ ja toteamisrajaksi 33 $\mu\text{g/l}$. Menetelmän todettiin olevan lineaarinen, kun näytteiden rautapitoisuus on välillä 40 $\mu\text{g/l}$ – 1500 $\mu\text{g/l}$. Menetelmän toistokyky todettiin hyväksi, ja siihen vaikuttaa eniten sarjan sisäinen hajonta. Sarjojen välisen hajonnan ei katsottu olevan tilastollisesti merkittävää. Menetelmän systemaattinen virhe on pientä ja sallituissa rajoissa. Menetelmän herkkyydeksi saatiin 0,0016 $\mu\text{g/l}$. Menetelmän epävarmuus on suuri etenkin näytteillä, jotka sisältävät rautaa alle 250 $\mu\text{g/l}$. Näytteiden, joiden pitoisuus on yli 250 $\mu\text{g/l}$, epävarmuus on korkea mutta sallituissa rajoissa. SFS 3028 -menetelmällä ja käytössä olevalla Hach-Lange 265 -menetelmällä ei katsota olevan systemaattista eroa t-testin mukaan.

Hach-Lange 270 TPTZ -menetelmällä ei saatu kunnollisia tuloksia, joita olisi voinut verrata mihinkään. Lähes kaikki näytteet menivät sameiksi reagenssipussilisäyksen jälkeen, ja pH:ta piti säätää useimmissa näytteissä reagenssi A:n lisäyksen jälkeen. Menetelmää ei testattu enempää ajan puutteen ja huonojen tuloksien takia.

11.2 Pohdinta

SFS 3028 –menetelmän epävarmuus jäi korkeaksi sekä alle ja yli 250 µg/l sisältäville näytteille. Etenkin alle 250 µg/l rautaa sisältävien näytteiden epävarmuus jäi korkeaksi eikä tuloksia voida pitää luotettavana noin suurella epävarmuudella. Epävarmuuteen vaikutti kuitenkin suuresti yksi näyte, joka nostaa melkein 10:llä epävarmuutta. Tuloksiin tulisi varmasti muutoksia, jos näytteitä analysoidaisiin lisää. Työskentelyn rutinoituessa tulokset paranevat ja epävarmuus pienenee.

SFS 3028 -menetelmään siirtyminen vaatisi lisäkokeiden tekemistä etenkin rinnakkaisnäytteiden osalta sekä nollanäytteiden osalta. Työssä haluttiin määritysrajaksi SFS:lle 20 µg/l ja eikä ne tämän työn puitteissa onnistunut. Mahdollisesti määritysraja ja toteamisraja voitaisiin saada alemmaksi poistamalla standardin ohjeen mukaisesti reagenssiliuosten rauta.

Liitteessä 3 on esitetty SFS 3028:lla ja Hach-Lange 265:llä mitattujen näytteiden tuloksia. Osassa tuloksissa näkyy myös sameus ja KMnO_4 -arvo. Suuret erot H-L:n ja SFS:n tuloksissa voivat johtua vedessä olevasta humuksesta (orgaaninen aines), johon rauta on sitoutunut. SFS 3028 -menetelmä mittaa kokonaisrautaa ja ottaa huomioon tämän sitoutuneen raudan. Keskimäärin SFS-menetelmällä mitattiin korkeampia tuloksia kuin Hach-Langella. Sameus ja KMnO_4 voivat antaa viitettä mahdollisesta orgaanisesta aineesta näytteessä. Sameus- ja kaliumpermanganaattituloksia oli kuitenkin liian vähän, jotta näistä tuloksista voitaisiin vetää mitään johtopäätöksiä.

Hach-Lange 270 TPTZ –menetelmän käyttöönottoa voitaisiin harkita, jos näytteiden sameiksi meneminen voitaisiin estää jotenkin.

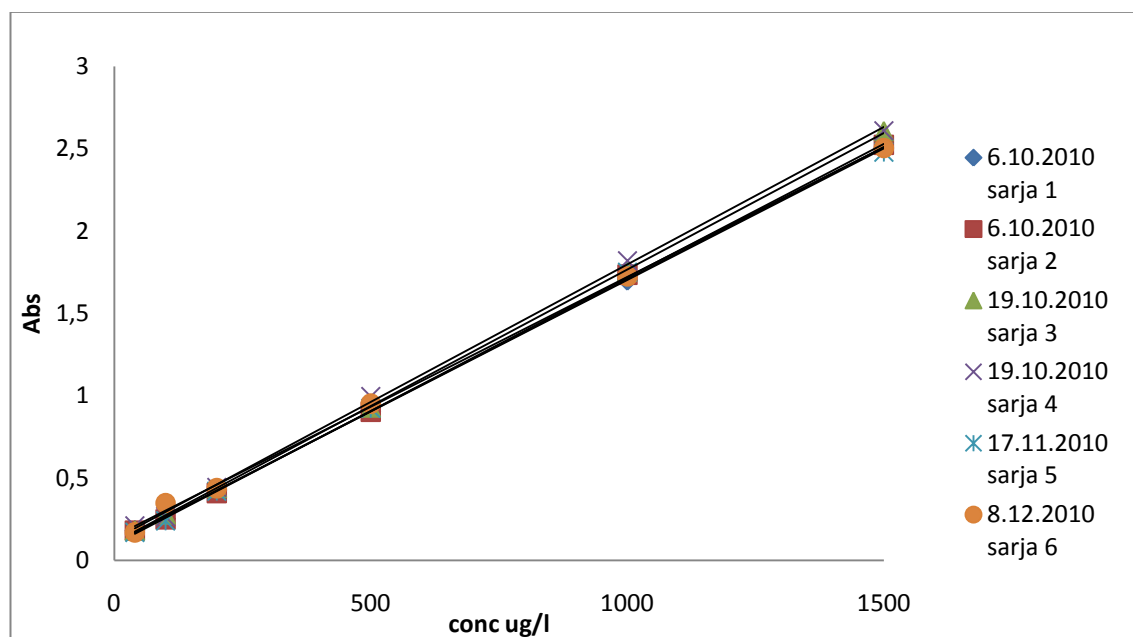
Lähteet

1. Porvoon elintarvikelaboratorio. (WWW-dokumentti.) Porvoon kaupunki.
<http://www.porvoo.fi/index.php?mid=158>. Päivitetty 24.1.2011. Luettu 18.2.2011
2. Talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista. (WWW-dokumentti.) Finlex. www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2000/20000461.19.5.2000. Luettu 2.2.2011.
3. Keinänen-Toivola Minna M., Ahonen Merja H., Kaunisto Tuija. Talousveden laatu Suomessa vuosina 1984 – 2006. Turku: Vesi-Instituutin julkaisuja 2.
4. SFS 3028. Veden raudan määrittäminen. Fotometrinen menetelmä. 1976. Suomen standardoimisliitto.
5. Hach Company. 2005. Method 8112 TPTZ. U.S.A.: Hach Company.
6. Hach Company. 2005. Method 8008 Ferrover. U.S.A.:Hach Company.
7. Palomäki, Jyrki. 1998. Humus- ja rautapitoisen pohjaveden kemiallis-biologinen käsittely. Vaasa: Länsi-Suomen ympäristökeskus.
8. Gray, N.F. 2008. Drinking Water Quality Problems and Solutions. Cambridge: Cambridge University Press.
9. Toivonen, J., Yliruokanen, I. 2004. Analyttisen kemian harjoitustyöt. Kvantitatiivinen analyysi. Helsinki: Otatieto.
10. Harris, Daniel C. 2010. Quantitative Chemical Analysis. New York: W.H. Freeman and Company.
11. Hitachi Model U-2001 UV/VIS Spectrophotometer User Manual.
12. Mäkinen, I., Suortti, A-M, Sares, R., Niemi, R. 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Helsinki: Suomen ympäristökeskus
13. EURACHEM Guide. 1998.The Fitness for Purpose of Analytical Methods. United Kingdom: EURACHEM Working Group.
14. Ehder, Tapio (toim.). 2005. Metrologian neuvottelukunta: Kemian metrologian opas. Julkaisu J6/2005. Helsinki.
15. Magnusson B., Näykki T., Hovind H., Krysell M.2004. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. Espoo
16. Workshop on validation of Chemical Methods .(WWW-dokumentti.)
<http://www.nmkl.org/Kurs/Validering07/ValidationJE.pdf>. Päivitetty 2007. Luettu 27.2.2011.

17. Crack-Set Sample Preparation LCW 902. (WWW-dokumentti.) http://www.hach-lange.co.uk/shop/action_q/download%3Bdocument/DOK_ID/14784053/type/pdf/lkz/GB/spkz/en/TOKEN/YPxBFBI3qLZzgmX98E4pzb6tgE/M/RwPZaA/AE_902_I_Druckf_blau.pdf. Edition 08/2001. Luettu 8.3.2011.
18. F-ratio table 2005. (WWW-dokumentti.) <http://www.sussex.ac.uk/Users/grahamh/RM1web/F-ratio%20table%202005.pdf>. Luettu 13.3.2011.
19. Yhdyskuntatekniikan ja ympäristön toimialue. 1990. Veden laatu ja korroosio vesijohdoissa, kaukolämpöjohdoissa ja kiinteistöjen vesi ja viemärlaitteistoissa. Helsinki: Suomen kaupunkiliitto.

Lineaarisuus: standardisuorat

Kuvassa on esitetty työssä tehdyt standardisuorat (40 µg/l – 1500 µg/l) ja taulukossa on esitetty suorien yhtälöt ja korrelaatiokertoimet.



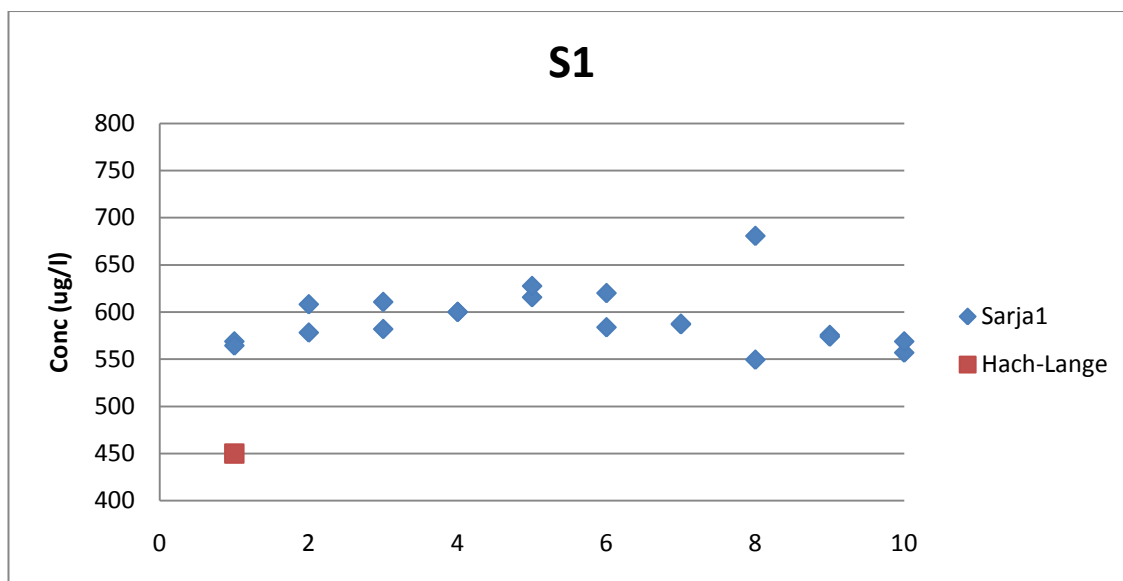
Kuva 3. Työn aikana tehdyt standardisuorat

Taulukko 7. Standardisuurien yhtälöt ja R^2 -arvot.

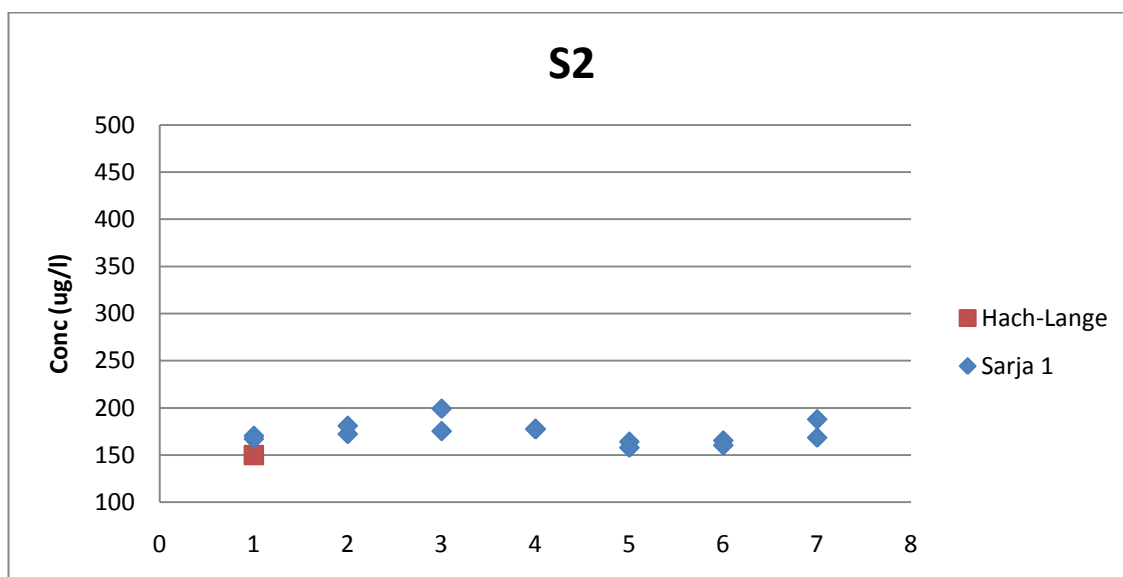
suoran yhtälö	R^2
$y_1 = 0,0016x + 0,1059$	0,9999
$y_2 = 0,0016x + 0,0989$	0,9998
$y_3 = 0,0017x + 0,1125$	0,9999
$y_4 = 0,0017x + 0,1262$	0,9993
$y_5 = 0,0016x + 0,1008$	0,9992
$y_6 = 0,0016x + 0,1477$	0,9991

Toistettavuus

Liitteessä 2 on esitelty toistettavuuskokeissa tehdyt kokeet graafisena esityksenä. Punainen piste kuvaajassa on Hach-Lange 265 -menetelmällä mitattu tulos kyseessä olevalla näytteelle.



Kuva 4. S1-näytesarjan rinnakkaisnäytteiden tulokset.



Kuva 5. S2-näytesarjan rinnakkaisnäytteiden tulokset.

SFS 3028 ja Hach-Lange 265 näytteiden vertailu*Taulukko 8. SFS 3028:n ja Hach-Lange 265:n näytteiden pitoisuudet sekä mahdolliset sameus- ja KMnO_4 -arvot.*

Näytteet	SFS (conc)	H-L (conc)	Sameus	KMnO_4
2449	248	< 50		
2573	2258***	2980		
2464	32*	60		
2450	42	< 50		
2492	2209***	300		
2514	2195***	2130		
2444	251	230		
2460	482	420	1,1	18
2747	924	740		
3004-4	288	250		30,9
3004-5	282	250		18,8
2438	2297**	7520/*		
2543	2297**	2830	37	23
2451	4*	< 50		
2468	2296**	800	56	13
3216-3	57	90		
3216-4	29*	70		
3160	293	270		
3173	116	160	1,2	5

Konsentraatiot ovat yksikössä $\mu\text{g/l}$

*Näytteet alle määrittäysrajan.

**Spektrofotometri ei anna tämän arvon yli enää tuloksia.

***yli määritetyn lineaarisen alueen.

/*laskettu laimennetusta näytteestä.